

Ph.D. disszertáció tézisei

**A BAKTERIÁLIS REAKCIÓCENTRUM
KÉSLELTETETT FLUORESZCENCIÁJA**

Turzó Kinga

Témavezető: Dr. Maróti Péter egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem, Biofizikai Tanszék

Szeged, 2000

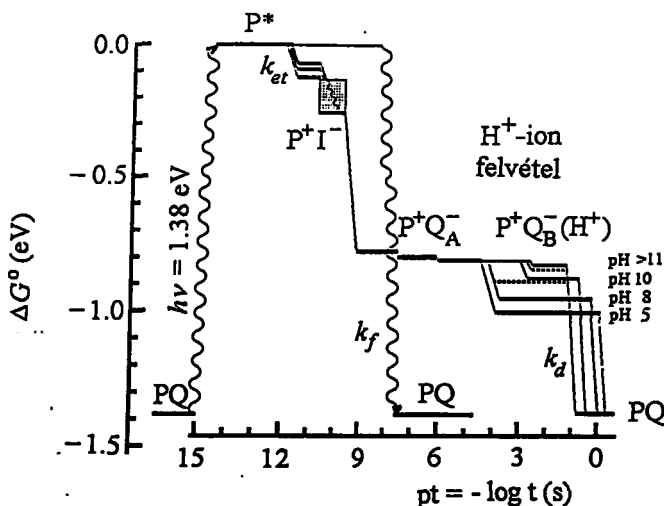
1. Tudományos előzmények, célkitűzések

A fotoszintézis a földi élet kulcsfontosságú folyamata, amelynek során a Nap fényenergiája, a szerves anyagok felépítéséhez nagy bőségben, hosszabb ideje rendelkezésre álló egyedüli szabadenergia-forma, az élő szervezetek életműködéséhez szükséges energiává alakul át. A fotoszintetizáló szervezetek (fotoszintetizáló baktériumok, algák, zöld növények) nemcsak önmagukat látják el energiával, hanem a tápláléklánc egészét: az őket fogyasztó szervezeteket, az utóbbiakkal táplálkozó élőlényeket, és így tovább. Jelentőségük energiaínséges korunkban az emberiség szempontjából is felbecsülhetetlen, mivel tiszta, folyamatosan regenerálódó energiaforrást jelentenek, és modellként szolgálnak a mesterséges napenergia-hasznosításhoz.

Az általunk vizsgált fotoszintetizáló bíorbaktériumok (*Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* és *Rb. capsulatus*) reakciócentruma (RC) a fotoszintézis kutatásban központi szerepet játszik, a fotoszintetizáló rendszerek modelljéül szolgál, mert ez a legegyszerűbb olyan integrális membránfehérje, amely a fotoszintézis alapfunkcióinak elvégzésére képes, és szerkezete atomi feloldással ismert. A bíorbaktériumok a fotofizikai és fotokémiai alapfolyamatokat tekintve ugyanúgy végzik fotoszintézisüket, mint azok a hárommilliárd évnél is régebben élt őseik, amelyek elsőként fejlesztették ki a napenergia hasznosításának képességét. Az elnyelt foton energiáját elektrosztatikai illetve elektrokémiai energiává alakítják, amely redoxpotenciálként, különböző ionok elektrokémiai gradienseként, vagy foszforilációs potenciálként raktározódik (ezek mind a Gibbs-szabadenergia különböző megnyilvánulási formái). Az így tárolt energiát használja fel a sejt alapvető folyamatainak működtetéséhez.

A bakteriális RC -ben végbemenő folyamatok (ld. az ábrát) közül az elmúlt évtizedekben a fotoszintetikus energiahasznosítás szempontjából kulcsfontosságú elektrontranszportot és protonálódási folyamatokat vizsgálták a legintenzívebben. Kiderült, hogy míg az RC-ben elnyelt majdnem minden foton töltéspárt hoz létre, vagyis a fotokémiai kvantumhatásfok közel 1, addig a fényfelhasználás energiahatásfoka jóval kisebb, mindössze 30-40% -os, mert az energia 60-70% -a elvész az elektronoknak a kofaktorok közötti vándorlása közben. A legnagyobb szabadenergia-veszteség a primér kinon (Q_A) redukálásához kapcsolódik, ami ugyanakkor azt is jelenti, hogy fiziológiás körülmények között ez a lépés teszi visszafordíthatatlanná a töltésszétválasztást. A kutatások során igen hamar világossá vált, hogy a fény-

hasznosítás energiahatásfoka és az elektronvándorlás kinetikája nagymértékben függ a keletkezett stabil töltéspárok energetikai viszonyaitól, ezért az utóbbiak felderítése alapvető fontosságú.



A bakteriális reakciócentrumban fényfelvillanás ($h\nu$, hullámos vonal) hatására végbemenő folyamatok logaritmusos időskálán, valamint a PQ alapállapot és a töltésszétválasztott állapotok (P^+I^- és P^+Q^-) szabadenergia szintjei a gerjesztett dimér energiaszintjéhez képest. Folyamatok: elektrontranszfer (vékony, folytonos vonalak) a bakteriofeofitinhez (I, k_{et} sebességi állandó), a primér (Q_A) és a másodlagos kinonhoz (Q_B); fehérje relaxáció (árnyékolt terület); töltésstabilizáció a konformációs heterogenitás következtében (egymáshoz közeli vastag vonalak); fényindukált protonfelvétel; töltésrekombináció (vékony vonalak, k_d sebességi állandó), másodlagos kinon-aktivitás hiányában a töltésrekombináció a $P^+Q_A^-$ állapoton keresztül történik (pontosított vonalak pH 10 és 11-nél). Az RC fényemissziója (a PQ állapot felé mutató hullámos vonal, sugárzási állandója k_f) kétféle lehet: prompt- ill. késleltetett fluoreszcencia. A késleltetett fluoreszcencia a P^* állapotnak a $P^+Q_A^-$ állapotból való termikus repopulációjából származik.

Az elektrontranszportlánc állapotainak energetikai vizsgálatára az egyensúlyi redox titrálás, a fotoakusztikus spektroszkópia, a késleltetett fluoreszcenciás módszer és -protonációs folyamatok esetén- az integrált protonkötés mérése használható. Közülük sok szempontból kiemelkedik a késleltetett fluoreszcenciás módszer, mivel a bakterioklorofill dimér késleltetett fluoreszcenciájának lecsengéséből közvetlenül meghatározhatók az elektrontranszportlánc reakcióinak termodinamikai jellemzői, figyelembe veszi a kialakuló töltéspár tagjai közötti, redox titrálással nem

detektálható elektrosztatikus kölcsönhatást, tipikus kinetikus módszer, vagyis – szemben az összes többivel- lehetőséget kínál a szabadenergia szinteknek az elektrontranszport folyamatok alatt várható gyors változásainak detektálására, valamint gyorsan elvégezhető, ezért sorozatmérésekre is alkalmas, ami mutánsok vizsgálatánál, ill. biotechnológiai alkalmazásokban komoly előny). A késleltetett fluoreszcencia emissziója a fotoszintetikus elektrontranszport melléktermékeként minden fotoszintetizáló növényben, minden körülmények között fellép, így méréséhez a vizsgált rendszeren semmiféle külső beavatkozást nem kell végezni, emellett igen kis hatásfokú, ún. szivárgási folyamat, így a belőle származó veszteség a fotoszintézis hatékonyságát csak elhanyagolható mértékben rontja.

Ezek a megfontolások késztettek arra, hogy a fotoszintézis elektrontranszport-folyamatai energetikájának felderítéséhez bakteriális reakciócentrumok késleltetett fluoreszcenciájának vizsgálatával próbáljak új ismereteket szerezni. Célul tűztem ki, hogy részletesen jellemzem a fotoszintézis energiahatásfokát leginkább csökkentő milliszekundumos folyamatokat tükröző késleltetett fluoreszcencia kinetikáját, és annak segítségével az egyes állapotok szabadenergiáit. Fontosnak tartottam nyomonkövetni a reakciócentrum egyes állapotaihoz tartozó másik két termodinamikai állapotfüggvény, az entalpia és az entrópia változásait, mert ezek felvilágosítást adhatnak a két állapotfüggvénynek a töltésstabilizációban játszott szerepéről és az RC fehérje szerkezeti átrendeződésének mértékéről a töltésstabilizáció során. A késleltetett fluoreszcencia pH-függésének tanulmányozása segíthet a protonmegkötésnek az egyes töltéspárok stabilizációjában játszott szerepe és az RC fehérje részei közti kölcsönhatások tisztázásában, az így kapott adatok pedig összevethetők az egyéb mérések (pl. protonkötés) és a modellszámítások eredményeivel. Az RC natív primér kinonjának más kinonra való kicserélésével vizsgáltam, hogyan befolyásolja a Q_A szabadenergiája az első stabil töltéspár stabilizációját. Az ionerősség változtatását azért tartottam fontosnak, mert a késleltetett fluoreszcenciára gyakorolt hatása adalékot szolgáltat a sók és az RC közti elektrosztatikus kölcsönhatás módjainak megértéséhez.

2. Anyagok és módszerek

Baktériumtörzsek:

- *Rb. sphaeroides* 2.4.1. vad típusú és R-26 karotinoidmentes mutánsa
- *Rb. capsulatus* vad típusú és RQrev4A félrevertáns mutánsa.

A *Rb. sphaeroides* reakciócentrumának izolálásánál és tisztításánál standard fehérje-tisztítási módszereket alkalmaztam: sejtek feltörése French press -szel, ultracentrifugálás, a kromatofóra feltárása LDAO -val, ammónium-szulfátos kicsapás és DEAE-Sephacell ioncserélő oszlopkromatográfia. A kinon-helyettesítést az Okamura és mtsi (1975), Liu és mtsi (1991), illetve Kálmán és Maróti (1994) által kidolgozott módszer szerint végeztem el. A kinonmentesített reakciócentrumok primér kinonkötőhelyének fotokémiai aktivitását vízőldékony menadionnal (MD, Sigma), vagy abszolút etanolban oldódó durokinonnal (DQ, Sigma) állítottam helyre.

A kinon-környéki mutációk vizsgálatához a *Rb. capsulatus* vad típusú és RQrev4A félvertáns mutánsainak reakciócentrumait tisztított állapotban, lefagyaszttva kaptuk, Dr. Pierre Sebban csoportjától (CNRS, Gif-sur-Yvette).

Az abszorpcióváltozás mérése:

Kísérleteim során gyakran meg kellett határozni a minta aktív reakciócentrum-koncentrációját, ill. a töltéspárok rekombinációs kinetikáját. Ezeket a méréseket az oxidált ill. redukált állapotú primér donor különbségi abszorpciós spektruma 430 nm-nél jelentkező csúcsánál végeztem, házi készítésű, kinetikus, egysugaras spektrofotométerrel.

A késleltetett- és a prompt fluoreszcencia mérése:

Az RC bakterioklorofill dimérje által emittált milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia kinetikájának felvételére egy speciálisan erre a célra tervezett mérőberendezést építettünk. A mérési nehézségeket a késleltetett fluoreszcencia rendkívül alacsony intenzitása (kvantumhatásfoka kb. 10^{-9}), kedvezőtlen spektrális elhelyezkedése (az infravörösben, 920 nm körül mérhető) és a gerjesztés alatt a minta által kibocsátott erős prompt fluoreszcencia okozza. A mintát Q-kapcsolt Nd:YAG lézer frekvencia kétszerezett fényimpulzusával (hullámhossz 532 nm, energia 100 mJ, félérték szélesség 5 ns) gerjesztettük. Az RC -t tartalmazó mintát alacsony fluoreszcenciájú kvarcküvetába helyeztük, hőmérsékletét termosztálható küvetatartóval állítottuk be és termoelemmel mértük. A mintából származó késleltetett fluoreszcenciát bikonvex lencse képezte le a gerjesztő fényre merőlegesen, infravörös felülatéresztő szűrőn át az infravörös-érzékeny fotoelektronsokszorozóra. A rendkívül intenzív prompt fluoreszcenciától a fotokatódot elektromechanikus fényzár védte, amely a gerjesztés alatt zárva volt, de a lézerfelvillanás után kb. 3 ms alatt kinyílt. A

jel/zaj viszonyt a fotoelektronsokszorozó $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra való hűtésével és a mérések átlagolásával növeltük. Általában 256 kinetikát átlagoltunk digitális oszcilloszkóp segítségével, 1 Hz -es (olyan reakciócentrumoknál amelyekben hiányzott a másodlagos kinon-aktivitás), ill. 0,24 Hz -es (Q_B -t is tartalmazó minták esetében) ismétlési frekvenciával. Az így kapott jelet számítógépben tároltuk és kiértékeljük.

A késleltetett fluoreszcencia lecsengése több exponenciális komponens lineáris kombinációjaként írható le, akárcsak a töltésrekombinációs kinetika. A nemlineáris legkisebb négyzetes illesztés is ugyanúgy történt, de ennek során rögzítettük az abszorpcióváltozással mért töltésrekombinációs kinetika felbontásából kapott időállandókat, mivel azok szórása kisebb.

Az RC által kibocsátott késleltetett ill. prompt fluoreszcencia integrált intenzitásának összehasonlításakor a prompt fluoreszcenciát ugyanolyan optikai és elektronikai (erősítés, szűrés) körülmények között mértük, mint a késleltetett fényt, csak a gerjesztés energiája volt eltérő: ilyenkor $0,77\text{ mJ} \pm 5\%$ volt a késleltetett fluoreszcencia mérésekor (ez az érték a telítési görbe lineáris tartományába esik), illetve $16,2\text{ nJ} \pm 10\%$ a prompt fluoreszcencia detektálásakor; ez utóbbi esetben a fényzár természetesen nyitva volt. A lézer energiáját kalibrált piroelektromos energia-mérővel határoztuk meg.

3. Új tudományos eredmények

- 1. Kifejlesztettem egy olyan készüléket amely alkalmas a bakteriális reakciócentrum késleltetett fluoreszcenciájának kb. 10^{-9} kvantumhatásfokú, kb. 1 ms-tól a szekundumos tartományig terjedő élettartamú komponenseinek mérésére 10 Hz/n ($n = 1,2,\dots,99$) alakban felírható tetszőleges ismétlési frekvenciánál, valamint a késleltetett és a prompt fluoreszcencia integrált intenzitásainak összehasonlításával képes az elektrontranszportlánc állapotai szabadenergiáinak abszolút meghatározására is. A Q -kapcsolt, frekvenciakétszerezett Nd:YAG lézer impulzusával gerjesztett késleltetett fluoreszcenciát a gerjesztés alatt elektromechanikus fényzárral védett, hűtött infravörös fotoelektronsokszorozó detektálja, és digitális oszcilloszkóp átlagolja. (I, II, IV)*
- 2. Kétállapotú tranziens rendszer modelljével pillanatszerű gerjesztést követően analitikus formában megadtam a fluoreszcencia időbeli lecsengését. A folyamatban résztvevő minden tranziens állapotnak a késleltetett fluoreszcencia 1-1 komponense*

felel meg. A fázisok időállandói a tranziens állapotok közötti előre irányuló reakciók időállandóit és a töltéstároló állapotok kiürülési idejét tükrözik. Amplitúdók a visszreakciók sebességeitől, ezen keresztül az egyes állapotok szabadenergia-szintjeitől függenek. (IV, VII)

A bakteriális reakciócentrumok késleltetett fluoreszcenciáját a gerjesztett bakterioklorofill dimér (P^*) emittálja. Ez a fluoreszcencia fotokémiai eredetű, mert a primér fotokémiai termékek visszreakcióiból keletkezik. Lecsengése több exponenciális komponensre bontható, ami arra utal, hogy a töltéssztabilizációban több tranziens állapot is részt vesz. A milliszekundumos és a szekundumos időtartományban -a kinon-akceptor komplex redox állapotától és helyreállítottságától függően- három exponenciális fázist tudunk felbontani, amelyek közül a két lassabbat korábban már más csoportok is megfigyelték, de még egyik tanulmányban sem dolgoztak ki olyan egységes modellt, amely megmagyarázná keletkezésüket. A késleltetett fluoreszcencia kinetikáját ill. a prompt- és a késleltetett fluoreszcencia közötti különbséget először egy olyan egyszerű (két tranziens állapotú) rendszerben írtam le, amelyben a gerjesztett pigment energiájának egy része átmenetileg egy töltésszétválasztott állapotban (P^+Q^-) tárolódik. Az egyszerű modell eredményeit a későbbiekben általánosítottam, és alkalmaztam egy több (négy) tranziens állapottal rendelkező bonyolultabb rendszerre, a reakciócentrumra.

3. *A milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia lecsengésében három exponenciális fázist találtam; a nagyon gyors, a gyors és a lassú komponens élettartama pH 8 -nál rendre 1,5 ms, 102 ms és 865 ms volt. A nagyon gyors komponens valószínűsít-hetően azon triplett állapotok közötti átalakulásokból származik, amelyek hosszú élettartamúak, a P^* -éhoz közeli szabadenergia szinten vannak, és a $P^+Q_A^-$ állapottal párhuzamosan képesek a gerjesztett dimérrel termikus egyensúlyba kerülni. A gyors komponens az elsődleges kinon (Q_A), a lassú pedig a másodlagos kinon (Q_B) energetikai és kinetikai változásait tükrözi. Meghatároztam a késleltetett fluoreszcencia fázisainak kvantumhatásfokait, értékeik pH 8-nál: $6,4 \cdot 10^{-9}$ a nagyon gyors, $2,2 \cdot 10^{-9}$ a gyors, és $2,6 \cdot 10^{-9}$ a lassú komponens esetén; kb. 5 nagyságrenddel alacsonyabbak, mint a prompt fluoreszcenciáé. (IV)*

A gyors komponens olyan RC -k esetében figyeltük meg, amelyekben (inhibitor hozzáadásával, vagy a másodlagos kinon eltávolításával) meggátoltuk a primér kinonról a másodlagos kinonra irányuló elektrontranszfert, és érzékenyen

reagál a pufferoldat fizikai-kémiai tulajdonságaira, a primér kinon kémiai természetére, és a fehérjekörnyezetre. Sebességi állandója megegyezik a $P^+Q_A^-$ állapot töltésrekombinációval történő eltűnésének (abszorpcióváltozás-mérésekkel meghatározható) sebességállandójával. A lassú komponens másodlagos kinonnal helyreállított RC -kben figyeltük meg, melynek időállandója a $P^+Q_B^-$ állapotnak a $P^+Q_A^-$ állapoton keresztüli, indirekt töltésrekombinációs folyamattal való eltűnésének időállandójával egyezik meg. E kísérleti tapasztalatok alapján a gyors és a lassú komponens eredete tisztázottnak tekinthető, eredményeink összhangban vannak mind az irodalmi adatokkal, mind pedig a késleltetett fluoreszcencia keletkezésére vonatkozó, részletesen kifejtett elméletünkkel. A nagyon gyors komponensre az irodalomban tőlünk független adat nem található. Noha a nagyon gyors komponens különleges hőmérsékletfüggése még további vizsgálatokat igényel, sok megfigyelésre magyarázatot tudunk adni az RC -ben végbemenő, ismert reakciók alapján.

4. *A bakterioklorofill dimér késleltetett fluoreszcencia és prompt fluoreszcencia intenzitásainak összehasonlításával meghatároztam az első és a második stabil töltés-pár energiaszintjét a P^+Q szinthez képest pH 8-nál. A $P^+Q_A^-$ és a $P^+Q_B^-$ szintek közötti szabadenergia különbséget (másodlagos kinon hiányában) -910 ± 20 meV -nak, míg a $P^+Q_B^-$ és a $P^+Q_A^-$ szintek szabadenergia különbségét -970 ± 20 meV -nak találtam. (II, VI)*

A $P^+Q_A^-$ és a $P^+Q_B^-$ állapotok (P^+ -éhoz viszonyított) abszolút szabadenergia-szintjeinek meghatározásánál felhasználtuk a sugárzásos átmenet Strickler-Berg összefüggésből meghatározott sebességi állandóját ($k_f = 8 \cdot 10^7$ s⁻¹), a prompt fluoreszcencia irodalomból vett hatásfokát ($4 \cdot 10^{-4}$) és a méréseinkből (a töltésrekombináció kinetikájából) adódó k_q sebességi állandót (865 ms)⁻¹.

5. *Meghatároztam a fentebb említett állapotok közötti szabadenergia különbségek pH-függését. A $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiája -65 meV -ot változik pH 11 és 5 között, egy jellegzetes inflexiós ponttal a lúgos tartományban. Az elsődleges szemikinin és a másodlagos kinon közelében lévő Glu L212 aminosav körüli protonálható csoportok közötti kb. 50 meV -os kölcsönhatási energia a két kinonkötőhely közötti funkcionális kapcsolatot bizonyítja. (I, II, IV)*

A $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiájának lúgos tartománybeli jelentős eltolódása (pH 8 fölött majdnem 50 meV-nyit változik) és az a tény, hogy a legnagyobb pK -

változás ($\Delta pK = 0,8$) a legmagasabb pK -val rendelkező csoportnál észlelhető, arra utal, hogy a Q_B közelében található Glu L212 körüli csoportok protonfelvételének jelentős szerepe van a $P^+Q_A^-$ töltéspár szabadenergiájának változásában. A Q_A és a Q_B oldalak közötti kölcsönhatás típusa és útja még nem tisztázott, mivel a köztük lévő távolság (kb. 1,7 nm) túl nagy ahhoz, hogy elektrosztatikus kölcsönhatásról lehessen szó. Feltételezik, hogy a funkcionális kapcsolatot a kinonok közti vas-hisztidin komplex segíti elő. A szabadenergia pH 7 alatt gyakorlatilag független a pH-tól, ami azt jelenti, hogy a Q_B ill. a Q_A körüli többi (savas) csoport érzéketlen a Q_A redox változásaira.

6. *Másodlagos kinon jelenlétében a késleltetett fluoreszcencia lassú és gyors komponenseinek amplitúdóarányából meghatároztam a második stabil töltéspár szabadenergia-szintjének pH-függését a gerjesztett dimér szintjéhez képest: -175 meV -ot változik pH 11 és 5 között, két inflexiós ponttal, a lúgos ill. a savas tartományban. Ezek az amplitúdóarányok kisebbek voltak, mint az abszorpció-változásnál kapott megfelelő amplitúdók arányai. (II, V, IV)*

A $P^+Q_B^-$ állapot szabadenergiájának változása a pH függvényében összetettebb (egy helyett két inflexiós pont), és nagyobb (65 meV helyett 175 meV), mint a $P^+Q_A^-$ állapoté, ami arra utal, hogy valószínűleg több protonálható csoport reagál a Q_B^- keletkezésére, és ezek a másodlagos kinonhoz közelebb helyezkednek el. Ez összhangban van azzal, hogy a Q_B kötőhely közelében több protonálható csoport található, mint a Q_A kötőhely szomszédságában.

7. *A szabadenergia pH-függése széles pH tartományban, különböző ionerősségeknél és kinonokkal is jól egyezik az integrált protonkötés alapján kapott eredményekkel, és azokkal a számításokkal, amelyek a szemikinin elektrosztatikus kölcsönhatását veszik figyelembe négy, egymástól független, protonálható csoporttal. (I, II, IV)*

A $P^+Q_B^-$ állapot esetében a középponti redoxpotenciál pH-függésén alapuló illesztés nagymértékű pK -eltolódást mutatott ki a legalacsonyabb és a legmagasabb pK -jú csoportnál ($\Delta pK = 1,8$ ill. 1,5), és ezek az eltolódások nagyobbak, mint a $P^+Q_A^-$ állapot esetén kapott legnagyobb pK -eltolódás (0,8). Irányított mutánsokon végzett tanulmányok során számos olyan protonálható aminosavat azonosítottak a Q_B kötőhely közelében, amelyek fontos szerepet játszanak a Q_B^- protonálódásában. A fentebb említett, legalacsonyabb pK -jú csoportot az Asp L213 aminosavval azonosítják, míg a legmagasabb pK -jú

csoport a Glu L212. A Q_B közelében más aminosavak is vannak (Asp L210, Asp M17, Asp H124, Asp H170 és Glu H173), amelyek savas csoportosulást (clustert) alkotnak az Asp L213 -al, de ezek kevésbé fontosak a szemikininok protonálódásában, amint azt az FTIR mérések is mutatják. A két kinon szabadenergiájának pH -függése közötti különbség abból származik, hogy a fentebb tárgyalt protonálható csoportok szignifikánsan kisebb (dielektromos) távolságra vannak a Q_B^- -től, mint a Q_A^- -től, és/vagy a szemikininok más csoportokkal is elektrosztatikus kölcsönhatásban lehetnek.

8. *Az ionerősség növelésével nőtt a késleltetett fluoreszcencia intenzitása, míg a protonálható aminosavak flash előtti és utáni pK-értékei csökkentek, akárcsak fény-indukált ΔpK változásai. Ezt a reakciócentrum és a só között fellépő két meghatározó elektrosztatikus kölcsönhatással, a protonálható csoportok és a felületi töltések közötti kötésekkel és az árnyékolással magyaráztam. (I, III)*

A sótitrálás során tett megfigyelésünk, hogy a sókoncentráció növelése destabilizálja a $P^+Q_A^-$ állapotot, éppen ellentétes azzal, amit a protonkoncentráció emelésekor tapasztaltunk, minthogy a pH csökkenése stabilizációt eredményezett. Ez igen meglepő, hiszen a H^+ ionoknak és a só-kationoknak (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) várhatóan hasonlóképpen, elektrosztatikus kölcsönhatások révén kellene kompenzálniuk a fényfelvillanás hatására keletkezett (extra) töltéseket, vagyis a töltéspár stabilitását ugyanúgy kellene befolyásolniuk. Az ellentétes hatás magyarázatát egyrészt abban kerestük, hogy az oldatban lévő ionok leárnyékolják a Q_A^- -on és a P^+ -on megjelenő töltések kölcsönhatását mind a protonálható csoportokkal, mind pedig a rögzített (negatív) felületi töltésekkel, másrészt pedig abban, hogy a kationok specifikusan kötődnek. A Debye-Hückel elmélet felhasználásával megbeccsültük a két egymással kölcsönhatásban lévő ponttöltés közötti távolságot. Az értékekből arra következtettünk, hogy a protonálható csoportok egyike sem lehet túl közel a kofaktorokon lévő töltésekhez. A fehérje felületi töltései esetünkben stabilizálják a $P^+Q_A^-$ dipólt, mivel a szabadenergia megváltozása magasabb ionerősségek felé növekszik.

9. *A késleltetett fluoreszcencia hőmérsékletfüggéséből meghatároztam a töltéssztérváltozásokhoz tartozó entalpia- és entrópiaváltozásokat: pH 8-nál $\Delta H_A = -820 \pm 40$ meV és $\Delta H_B = -920 \pm 60$ meV. Ez az eredmény bizonyítja, hogy a töltéssztabilizálódás nagymértékben az entalpiaváltozás által meghajtott*

folyamat, és a reakciócentrum-fehérje a töltésstabilizáció során csak kis relaxációs mozgásokat végez. (I, II)

Számos tanulmány foglalkozott már e termodinamikai paraméterek vizsgálatával, de ennek ellenére a különböző módszerekkel (pl. fotoakusztikus, potenciometrikus és spektroszkópiás mérések) kapott eredmények még mindig erősen eltérnek egymástól. Az eltérések oka a baktériumok ill. az izolálásuk közti különbségekben és bizonyos módszerek hiányosságaiban (műtermékek, szisztematikus hibák) keresendő. Késleltetett fluoreszcenciás méréseink arról tanúskodnak, hogy a szabadenergia megváltozásában az entalpikus tag a meghatározó, az entrópikus rész mindössze 5-10%.

10. *A $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiáját befolyásolja a primér kinon szerkezete és redoxpotenciálja. A natív ubikinon-10 más kinonokkal (durokinonnal ill. menadionnal) való helyettesítése szignifikánsan megváltoztatta a töltéspár rekombinációjának sebességi állandóját, vagyis a töltéspár stabilizációjában jelentős szerepe van a primér kinon in situ szabadenergiájának. (IV, VI)*

A sebességi állandókat meghatároztam a töltésrekombinációs kinetikából, és a késleltetett fluoreszcencia lecsengéséből is. A változást mindkét mérés során észleltem: míg UQ-10 esetében 113 ms -ot mértem, addig MD -vel a primér kinon helyén 131 ms -ot, DQ -val pedig 478 ms -ot kaptam pH 7 -nél. A DQ -val való helyettesítés nem okoz nagy változást a szabadenergia pH-függésének jellegében, de a szabadenergia szint a natív kinonéhoz képest kb. 30 meV -tal alacsonyabb, összhangban azzal, hogy a durokinon középponti redoxpotenciálja kb. 30 mV -tal eltér az ubikinonétól. A MD -os minták esetében alig észlelhető pK-eltolódást ill. csekély szabadenergia változást kaptunk, amit a protonfelvétel mérések is alátámasztanak.

11. *Empirikus összefüggést találtam a primér kinon in situ szabadenergiája (G_A^0) és a töltésrekombináció sebességi állandója (k_{AP}) között, amely magas potenciálú kinonok (ilyen a natív kinon is) esetén jobb közelítést ad a Gunner-Dutton összefüggésnél, és lehetővé teszi a szabadenergia szintek egyszerű meghatározását a könnyen meg-mérhető rekombinációs időállandókból. (IV)*

A kinonhelyettesítésekkel kapott saját eredményeink és az ezzel kapcsolatos, nemrég közölt tanulmányok arra késztettek bennünket, hogy mi is megvizsgáljuk a szabadenergia és a töltésrekombináció közötti összefüggést. A $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$

visszreakció, amelyhez aktivációs energia szükséges, kétféleképpen mehet végbe: a $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiájától függően direkt módon (ha $\Delta G_A^0 < -800$ meV; alagúteffektussal), vagy indirekt úton, a termikusan gerjesztett P^+I^- állapoton keresztül. Áttekintettük az irodalomban fellelhető, olyan kinonhelyettesített RC -kre vonatkozó adatokat, amelyekben a visszreakció direkt módon zajlik le, majd három görbét illesztettünk az adatokra: a Gunner-Dutton összefüggés alapján, a Marcus elmélet alapján, és lineáris összefüggést feltételezve. Ebben a szabadenergia tartományban a pontok erős szóródása miatt nincs alapunk arra, hogy ne a legegyszerűbb, lineáris függvénykapcsolatot feltételezzük, annál is inkább, mert az optimális illesztésre kapott, a mérési pontok illeszkedését jellemző relatív χ_{rel}^2 érték az egyenesre volt a legkisebb, annak dacára, hogy másik két függvény bonyolultabb, több lebegő paramétert tartalmaz.

12. *Meghatároztam a Rb. capsulatus vad típusú reakciócentruma első stabil töltéspárjának energiaszintjét a gerjesztett diméréhez képest: -920 ± 20 meV, pH 7-nél. A $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiája vad típusú RC esetében pH 6 és 11 között 51 meV -ot változott, RQrev4A (félrevertáns) mutáns esetében pedig pH 7 és 11 között 60 meV -ot változott. A vad típusú RC entalpia változására -840 ± 40 meV -ot, míg a mutánsra -895 ± 40 meV -ot kaptam.*

Eredményeink alátámasztják azt a megfigyelést, hogy ez a mutáció nem okoz túl nagy változást az RC működésében. Minthogy azonban a késleltetett fluoreszcencia módszere elég érzékeny ahhoz, hogy kisebb változásokat is kimutasson, érdemes más mutánsokat is vizsgálni vele.

4. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

- I. Turzó K., Laczkó G. and Maróti P.: Delayed fluorescence study on $P^*Q_A \rightarrow P^+Q_A^-$ charge separation energetics linked to protons and salt in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. Photosynth. Res., 55: 235-240, (1998).
- II. Turzó K., Laczkó G. and Maróti P.: Proton binding is part of protein relaxation of flash-excited reaction center from photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. Israel Journal of Chemistry, Vol. 39, issues 3-4, 447-455 (1999).
- III. Kálmán L., Turzó K. and Maróti P.: Probing reaction center protonation by electrochromic absorption changes of cofactors in *Rhodobacter sphaeroides*. Photosynthetica, 28 (2): 185-194 (1993).
- IV. Turzó K., Laczkó G., Filus Z. and Maróti P.: Quinone-dependent delayed fluorescence from reaction center of photosynthetic bacteria. Biophysical Journal, (a bíráló után; javított példány visszaküldve, 2000).
- V. Turzó K., Laczkó G., Filus Z. and Maróti P.: Comparison of energetics of $P^*Q_A \rightarrow P^+Q_A^-$ and $P^*Q_B \rightarrow P^+Q_B^-$ charge separation by detection of delayed fluorescence of the bacteriochlorophyll dimer in reaction centers of *Rb. Sphaeroides*. In "Photosynthesis: Mechanisms and Effects" (Ed: G. Garab), Vol. II, 837-840, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1998).
- VI. Maróti P., Turzó K., Laczkó G. and Filus Z.: Quinone-dependent energetics of charge separated states of bacterial reaction center. Biophysical Journal, 78(1), 338A (2000).
- VII. Maróti P., Turzó K., Laczkó G. és Filus Z.: Fehérjék késleltetett fluoreszcenciája. In „A lumineszcencia kutatások aktuális kérdései”. Szerk.: Marek N. és Szabó K., Pécs, XXII. kötet, 35-54 oldal (1999).